



COPY OF PAPERS
ORIGINALLY FILED

Attorney's Docket No.: 06501-101001-1652 1675

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Katsumi Fujimoto et al.
Serial No. : 10/078,650
Filed : February 19, 2002
Title : NOVEL bHLH TYPE TRANSCRIPTION FACTOR GENES DEC2

Art Unit : 1645
Examiner : Unknown

Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

RECEIVED
JUN 27 2002

TECH CENTER 1600/2900

TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT UNDER 35 USC §119

Applicants confirm their claim of priority under 35 USC §119 from the following application: Japanese Application No. 11-233286, filed August 19, 1999.

A certified copy of the application from which priority is claimed is submitted herewith.

Please apply any charges or credits to Deposit Account No. 06-1050.

Respectfully submitted,

Date: June 17, 2002

Janis K. Fraser, Ph.D., J.D.
Reg. No. 34,819

Fish & Richardson P.C.
225 Franklin Street
Boston, Massachusetts 02110-2804
Telephone: (617) 542-5070
Facsimile: (617) 542-8906

20452010.doc

RECEIVED
JUL 25 2002
TECH CENTER 1600/2900

CERTIFICATE OF MAILING BY FIRST CLASS MAIL

I hereby certify under 37 CFR §1.8(a) that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail with sufficient postage on the date indicated below and is addressed to the Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.

June 17, 2002
Date of Deposit

Signature

KATHLEEN PHILPOT
Typed or Printed Name of Person Signing Certificate



日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

RECEIVED
JUN 27 2002
TECH CENTER 1600/2900

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

1999年 8月19日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第233286号

[ST.10/C]:

[JP1999-233286]

出願人

Applicant(s):

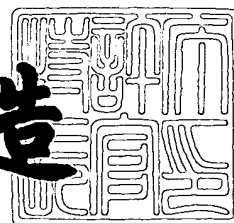
中外製薬株式会社

RECEIVED
JUL 25 2002
TECH CENTER 1600/2900

2002年 3月15日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2002-3017608

【書類名】 特許願

【整理番号】 C1-107

【提出日】 平成11年 8月19日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/12

【発明者】

 【住所又は居所】 広島県広島市南区旭 1 - 3 - 1 1 - 2 0 2

 【氏名】 藤本 勝巳

【発明者】

 【住所又は居所】 広島県広島市南区出汐 3 - 4 - 3 1 - 4 0 4

 【氏名】 申 鳴

【発明者】

 【住所又は居所】 広島県広島市東区牛田早稲田 3 - 6 - 9 - 5 0 1

 【氏名】 加藤 幸夫

【特許出願人】

 【識別番号】 000003311

 【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100102978

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

 【識別番号】 100108774

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 041092

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規 b H L H 型転写因子遺伝子、D E C 2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記 (a) から (d) のいずれかに記載の DNA。

(a) 配列番号：1 に記載の塩基配列のコード領域を含む DNA。

(b) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA

(c) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA。

(d) 配列番号：1 に記載の塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA であって、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA。

【請求項 2】 請求項 1 に記載の DNA によりコードされるタンパク質。

【請求項 3】 請求項 1 に記載の DNA が挿入されたベクター。

【請求項 4】 請求項 3 に記載のベクターを保持する宿主細胞。

【請求項 5】 請求項 4 に記載の宿主細胞を培養し、該宿主細胞またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収する工程を含む、請求項 2 に記載のタンパク質の製造方法。

【請求項 6】 請求項 2 に記載のタンパク質の部分ペプチド。

【請求項 7】 配列番号：1 に記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖に相補的な少なくとも 15 ヌクレオチドを含む DNA。

【請求項 8】 請求項 2 に記載のタンパク質に結合する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 該タンパク質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、

(b) 該タンパク質またはその部分ペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、

(c) 該タンパク質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選

択する工程、を含む方法。

【請求項 9】 請求項 2 に記載のタンパク質に結合する化合物。

【請求項 10】 抗体である、請求項 9 に記載の化合物。

【請求項 11】 請求項 8 に記載の方法により単離されうる、請求項 9 に記載の化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な bHLH 型転写因子及びその遺伝子に関する。これら分子は、例えば、医薬品開発の分野において利用しうる。

【0002】

【従来の技術】

動物の発生や分化は、組織分化や細胞増殖を制御するさまざまな転写因子により調節されている。特に、bHLH（塩基性ドメイン-ヘリックス-ループ-ヘリックス構造）型の転写因子は、筋形成（Weintraub, H. et al., 1991, Science 251:761-6）、神経形成（Jan Y.N. and Jan L.Y., 1993, Cell 75: 827-830）、および造血（Zhuang, Y. et al., 1994, Cell 79: 875-884）などの組織分化などにおいて、細胞増殖や分化の制御を行っていることが報告されている。bHLH型の転写因子は、蛋白質のダイマー形成を媒介する60～70アミノ酸の保存された領域（bHLH構造）により特徴付けられる転写因子である。多くの場合、HLHドメインはDNA結合に必要な塩基性(b)ドメインの直下に位置する。一般に、これらの蛋白質はホモダイマーまたはヘテロダイマーを形成してDNAに結合し、転写を調節する（Jan Y.N. and Jan L.Y., 1993, Cell 75: 827-830）。構造的、機能的特徴から、bHLH転写因子はいくつかのファミリーに分類される（Dang, C. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 559-602; Ohsako, S. et al., 1994, Genes Dev. 8: 2743-2755）。その中でも、シヨウジョウバエ hairy [h]（Rushlow, C.A. et al., 1989, EMBO J. 8: 3095-3103）および enhancer-of-split [E(spl)]（Klamt, C. et al., 1989, EMBO J. 8: 203-210）の哺乳動物ホモログであるHESファミリーは神経分化に関与しており、転写のリプレッサー（負の調節

因子)として機能していることが報告されている (Sasai, Y. et al., 1992, *Genes Dev.* 6: 2620-2634; Ishibashi, M. et al., 1993, *Eur. J. Biochem.* 215: 645-652; Akazawa, C. et al., 1992, *J. Biol. Chem.* 267: 21879-21885; Ohsako, S. et al., 1994, *Genes Dev.* 8: 2743-2755; Dawson, S.R. et al., 1995, *Mol. Cell. Biol.* 15: 6923-6931; Jan Y.N. and Jan L.Y., 1993, *Cell* 75: 827-830)。

【 0 0 0 3 】

本発明者らは以前、サブトラクション法により、ジブチリルcAMPで軟骨形質を維持したヒト軟骨培養細胞で特異的に発現が誘導される bHLH型の転写因子 DEC1 をクローニングした (特開平11-75882)。DEC1は hairy、enhancer-of-split [E(spl)]、および HESファミリー (Sasai, Y. et al., 1992, *Genes Dev.* 6: 2620-2634; Ishibashi, M. et al., 1993, *Eur. J. Biochem.* 215: 645-652) と同一性を有しており、系統的にこれらの転写因子と関連する新規なbHLH型転写因子であると考えられた。DEC1は軟骨細胞に限らず、ヒトの多数の組織で発現が見られ、また、多くの細胞でcAMPはDEC1 mRNAの発現を誘導することから、軟骨細胞の分化調節のみならず、他の組織の分化や細胞増殖の制御にも関与していることが示唆されている (M. Shen et al., 1997, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236: 294-298)。

【 0 0 0 4 】

h / E(spl) / HES と比較的高い同一性を示すbHLH型転写因子としては、DEC1 以外にも、マウス *Stral3* (M. Boudjelal et al., *Genes Dev.* 11: 2052-2065 (1997)) および ラット *SHARP* (M. J. Rossner et al., *Mol. Cell. Neurosci.* 9: 460-475 (1997)) が同定されている。マウス *Stral3* は胚性カルシノーマ細胞株 P19のレチノイン酸処理により発現が誘導され、高発現により神経細胞分化を誘導する。また、ヘテロダイマーを形成した場合、他の転写因子の転写活性化を抑制することから、転写リプレッサーとして機能していると予想されている。胚発生において、*Stral3*は神経性外胚葉に加え、内胚葉や中胚葉でも発現が見られる (M. Boudjelal et al., *Genes Dev.* 11: 2052-2065 (1997))。ラット *SHARP* は、胚発生後期および出生後に発現が高まるbHLH型転写因子であり、脳の可塑

性において機能すると予想されている。また、PC12細胞へのNGF添加や、*in vivo*でのカイニン酸添加により発現が誘導される。ラット SHARPには、組織発現分布の異なる2つの遺伝子 SHARP-2および SHARP-1 が同定されている。このことから、ヒトDEC1においても、他の類似遺伝子と共にサブファミリーを形成していることが予想される。これらの未知のbHLH型転写因子を単離することは、これまでにない医薬品の開発のための重要なステップになると考えられる。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、新規なbHLH型転写因子及びその遺伝子、並びにそれらの製造および用途を提供することを課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

DEC1サブファミリーを構成する新規転写因子をクローニングするため、ESTデータベースよりDEC1と類似性を有するヒト cDNA断片を検索した。その結果見出されたcDNA断片の塩基配列情報を基にプライマーを合成し、ヒト軟骨細胞のcDNAライブラリーを鋳型にしてPCRクローニングを行い、さらに 3' RACEおよび 5' RACE 法により全長cDNA配列を決定した。「DEC2」と名付けられたこのcDNAは、全長約3.2kbで、379アミノ酸からなる分子量42.5kDaの蛋白質をコードしていた。アミノ酸配列はラットSHARP-1と最も高い類似性を示し、特にN半側では90%以上一致していたが、C半側での類似性は低く、一部の配列のみ一致していた。bHLH領域は高い類似性を示したことから、この蛋白質はDEC1サブファミリーの新規メンバーであると考えられる。

【0007】

本発明の新規bHLH型転写因子「DEC2」は、発生や組織分化を制御するための新しい因子として有用であるほか、発生段階や細胞分化を測定するためのマーカーとして利用することが可能である。さらに、本発明のタンパク質が関与する種々の疾患に対する医薬品開発のための標的としても有用であると考えられる。

【0008】

本発明は新規なbHLH型転写因子およびその遺伝子、並びにそれらの製造及び用

途に関し、より具体的には、

(1) 下記 (a) から (d) のいずれかに記載のDNA、

(a) 配列番号：1 に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。

(b) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA。

(c) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列において1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNA。

(d) 配列番号：1 に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNA。

(2) (1) に記載のDNAによりコードされるタンパク質、

(3) (1) に記載のDNAが挿入されたベクター、

(4) (3) に記載のベクターを保持する宿主細胞、

(5) (4) に記載の宿主細胞を培養し、該宿主細胞またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収する工程を含む、(2) に記載のタンパク質の製造方法、

(6) (2) に記載のタンパク質の部分ペプチド、

(7) 配列番号：1 に記載の塩基配列からなるDNAまたはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含むDNA、

(8) (2) に記載のタンパク質に結合する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 該タンパク質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、

(b) 該タンパク質またはその部分ペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、

(c) 該タンパク質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法、

(9) (2) に記載のタンパク質に結合する化合物、

(10) 抗体である、(9)に記載の化合物、

(11) (8)に記載の方法により単離されうる、(9)に記載の化合物、に関する。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明は、新規bHLH型転写因子および該タンパク質をコードするDNAを提供する。本発明者らにより単離されたbHLH型転写因子ヒト「DEC2」のcDNAの塩基配列を配列番号：1に、該cDNAによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：2に示す。該タンパク質は、本発明者らにより既にクローニングされているbHLH型転写因子 DEC1 とホモロジーを有するタンパク質として、ヒト軟骨細胞由来cDNAから単離された。単離されたヒト「DEC2」遺伝子は379アミノ酸のタンパク質をコードすると予想され、ラットにおいて中枢神経系細胞の可塑性に関与していることが示唆されているbHLH型転写因子 SHARP と、bHLH領域において高い相同性を示した。これら事実から、本発明の「DEC2」遺伝子は、軟骨を含む組織の分化や増殖のみならず、成体の様々な組織の機能にも関与していることが示唆される。本発明の「DEC2」タンパク質および該タンパク質をコードするDNAは、組織分化や細胞機能を制御するための因子や分化マーカーとして有用であるほか、本発明のタンパク質が関与する疾患の診断、予防、および治療への応用も可能であると考えられる。

例えば、「DEC2」は、軟骨の分化や変形のメカニズムを解明する上で重要であることに加え、変形性関節症や慢性関節リウマチなどに対する遺伝子治療の開発にも利用されることが期待される。

【0010】

本発明は、また、ヒト「DEC2」タンパク質（配列番号：2）と機能的に同等なタンパク質を包含する。このようなタンパク質には、例えば、ヒト「DEC2」タンパク質に対応する他の生物由来のホモログタンパク質、およびヒト「DEC2」タンパク質の変異体が含まれる。本発明において「機能的に同等」とは、対象となるタンパク質がbHLH型転写因子の機能を有することを指す。bHLH型転写因子の機能としては、ホモダイマー（または他のbHLH型転写因子とヘテロダイマー）を形

成し、転写活性を負または正に調節する活性を有することを指す。また、bHLH型転写因子は、CANNTG および／または CACNAG への結合活性を有することが考えられる。CANNTG および／または CACNAG への結合活性の測定方法は公知である（例えば、Ohsako et al. (1994) *Genes & Dev.* 8. 2743-2755）。

【0011】

あるタンパク質と機能的に同等なタンパク質を調製するための、当業者によく知られた方法としては、タンパク質に変異を導入する方法が知られている。例えば、当業者であれば、部位特異的変異誘発法（Hashimoto-Gotoh, T. et al. (1995) *Gene* 152, 271-275, Zoller, MJ, and Smith, M. (1983) *Methods Enzymol.* 100, 468-500, Kramer, W. et al. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 9441-9456、Kramer W, and Fritz HJ (1987) *Methods. Enzymol.* 154, 350-367, Kunkel, TA (1985) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82, 488-492, Kunkel (1988) *Methods Enzymol.* 85, 2763-2766) などを用いて、ヒト「DEC2」タンパク質（配列番号：2）のアミノ酸に適宜変異を導入することにより、該タンパク質と機能的に同等なタンパク質を調製することができる。また、アミノ酸の変異は自然界においても生じうる。このように、ヒト「DEC2」タンパク質（配列番号：2）のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が変異したアミノ酸配列を有し、該タンパク質と機能的に同等なタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。このような変異体における、変異するアミノ酸数は、通常、100アミノ酸以内であり、好ましくは、50アミノ酸以内であり、さらに好ましくは20アミノ酸以内であり、さらに好ましくは10アミノ酸以内であり、さらに好ましくは5アミノ酸以内であると考えられる。

【0012】

変異するアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸（A, I, L, M, F, P, W, Y, V）、親水性アミノ酸（R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T）、脂肪族側鎖を有するアミノ酸（G, A, V, L, I, P）、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸（S, T, Y）、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸（C, M）、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸（D, N, E, Q）、

塩基含有側鎖を有するアミノ酸 (R、K、H)、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸 (H、F、Y、W) を挙げることができる (括弧内はいずれもアミノ酸の一文字標記を表す)。

【0013】

あるアミノ酸配列に対する 1 又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するタンパク質がその生物学的活性を維持することはすでに知られている (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)。

【0014】

ヒト「DEC2」タンパク質のアミノ酸配列に複数個のアミノ酸残基が付加されたタンパク質には、ヒト「DEC2」タンパク質を含む融合タンパク質が含まれる。融合タンパク質は、ヒト「DEC2」タンパク質と他のペプチド又はタンパク質とが融合したものであり、本発明に含まれる。融合タンパク質を作製する方法は、ヒト「DEC2」タンパク質 (配列番号：2) をコードする DNA と他のペプチド又はタンパク質をコードする DNA をフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよく、当業者に公知の手法を用いることができる。本発明のタンパク質との融合に付される他のペプチド又はタンパク質としては、特に限定されない。

【0015】

本発明のタンパク質との融合に付される他のペプチドとしては、例えば、FLAG (Hopp, T. P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210)、6 個の His (ヒスチジン) 残基からなる 6×His、10×His、インフルエンザ凝集素 (HA)、ヒト c-myc の断片、VSV-GP の断片、p18HIV の断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV 40T 抗原の断片、lck tag、 α -tubulin の断片、B-tag、Protein C の断片等の公知のペプチドを使用することができる。また、本発明のタンパク質との融合に付される他のタンパク質としては、例えば、GST (グルタチオン-S-トランス

フェラーゼ)、HA (インフルエンザ凝集素)、イムノグロブリン定常領域、 β -ガラクトシダーゼ、MBP (マルトース結合タンパク質) 等が挙げられる。

市販されているこれらペプチドまたはタンパク質をコードするDNAを本発明のタンパク質をコードするDNAと融合させ、これにより調製された融合DNAを発現させることにより、融合タンパク質を調製することができる。

【0016】

また、あるタンパク質と機能的に同等なタンパク質を調製する当業者によく知られた他の方法としては、ハイブリダイゼーション技術 (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989) を利用する方法が挙げられる。即ち、当業者であれば、ヒト「DEC2」タンパク質をコードするDNA配列 (配列番号: 1) もしくはその一部を基に、これと相同性の高いDNAを単離して、該DNAからヒト「DEC2」タンパク質と機能的に同等なタンパク質を単離することも通常行いうることである。このように、ヒト「DEC2」タンパク質をコードするDNAからなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、ヒト「DEC2」タンパク質と機能的に同等なタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。このようなタンパク質としては、例えば、ヒト以外の哺乳動物のホモログ (例えば、サル、マウス、ラット、ウサギ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコの遺伝子がコードするタンパク質が挙げられる。ヒト「DEC2」タンパク質をコードするDNAと相同性の高いcDNAを、動物から単離する場合、脳、骨格筋、精巣、胎盤、大腸、脾臓、軟骨などの組織を用いることが好ましいと考えられる。

【0017】

ヒト「DEC2」タンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNAを単離するためのハイブリダイゼーションの条件としては、当業者であれば適宜選択することができる。ストリンジントなハイブリダイゼーションの条件は、例えば、6×SSC (0.9M 塩化ナトリウム, 0.09M クエン酸ナトリウム), 0.5% SDS, 10mM EDTA, 5×Denhardt's solution (0.1%(w/v) Ficoll, 0.1%(w/v) ポリビニルピロリドン (polyvinylpyrrolidone), 0.1%(w/v) BSA), 10mg/ml 変性サケ精子DNA の溶液中で、60℃でハイブリダイゼーションを行う条件である。より好まし

いストリンジェントな条件は、上記の溶液中で68℃でハイブリダイゼーションを行う条件である。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては温度以外にも塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

また、ハイブリダイゼーションにかえて、ヒト「DEC2」タンパク質をコードするDNA（配列番号：1）の配列情報を基に合成したプライマーを用いる遺伝子増幅法、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法を利用して単離することも可能である。

【0018】

これらハイブリダイゼーション技術や遺伝子増幅技術により単離されるDNAがコードする、ヒト「DEC2」タンパク質と機能的に同等なタンパク質は、通常、ヒト「DEC2」タンパク質（配列番号：2）とアミノ酸配列において高い相同性を有する。本発明のタンパク質には、ヒト「DEC2」タンパク質と機能的に同等であり、かつ配列番号：2に示されるアミノ酸配列と高い相同性を有する蛋白質も含まれる。高い相同性とは、通常、60%以上の同一性、好ましくは70%以上の同一性、さらに好ましくは80%以上の同一性を指す。タンパク質の相同性を決定するには、文献（Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730）に記載のアルゴリズムにしたがえばよい。

【0019】

本発明のタンパク質は、後述するそれを産生する細胞や宿主あるいは精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点又は糖鎖の有無や形態などが異なり得る。しかしながら、得られたタンパク質が、ヒト「DEC2」タンパク質と同等の機能を有している限り、本発明に含まれる。例えば、本発明の蛋白質を原核細胞、例えば大腸菌で発現させた場合、本来の蛋白質のアミノ酸配列のN末端にメチオニン残基が付加される。本発明の蛋白質はこのような蛋白質も包含する。

【0020】

本発明のタンパク質は、当業者に公知の方法により、組み換えタンパク質として、また天然のタンパク質として調製することが可能である。組み換えタンパク

質であれば、本発明のタンパク質をコードするDNA(例えば配列番号：1に記載の塩基配列を有するDNA)を、適当な発現ベクターに組み込み、これを適当な宿主細胞に導入して得た形質転換体を回収し、抽出物を得た後、イオン交換、逆相、ゲル濾過などのクロマトグラフィー、あるいは本発明のタンパク質に対する抗体をカラムに固定したアフィニティークロマトグラフィーにかけることにより、または、さらにこれらのカラムを複数組み合わせることにより精製し、調製することが可能である。

【0021】

また、本発明のタンパク質をグルタチオンSトランスフェラーゼタンパク質との融合タンパク質として、あるいはヒスチジンを複数付加させた組み換えタンパク質として宿主細胞（例えば、動物細胞や大腸菌など）内で発現させた場合には、発現させた組み換えタンパク質はグルタチオンカラムあるいはニッケルカラムを用いて精製することができる。

融合タンパク質の精製後、必要に応じて融合タンパク質のうち、目的のタンパク質以外の領域を、トロンピンまたはファクターXaなどにより切断し、除去することも可能である。

【0022】

天然のタンパク質であれば、当業者に周知の方法、例えば、本発明のタンパク質を発現している組織や細胞の抽出物に対し、後述する本発明のタンパク質に結合する抗体が結合したアフィニティークラムを作用させて精製することにより単離することができる。抗体はポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。

【0023】

本発明は、また、本発明のタンパク質の部分ペプチドを包含する。本発明の部分ペプチドは、少なくとも8アミノ酸以上、好ましくは15アミノ酸以上、さらに好ましくは30アミノ酸以上、さらに好ましくは50（例えば、100アミノ酸以上）のアミノ酸配列からなる。該部分ペプチドは、例えば、本発明のタンパク質に対する抗体の作製、本発明のタンパク質に結合する化合物のスクリーニングや、本発明のタンパク質の促進剤や阻害剤のスクリーニングに利用し得る。また、本発

明のタンパク質のアンタゴニストや競合阻害剤になり得る。本発明のタンパク質の部分ペプチドとしては、例えば、配列番号：2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質のbHLH領域を含む部分ペプチドが挙げられる。

本発明の部分ペプチドは、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明のタンパク質を適切なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成は、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによってもよい。

【0024】

本発明のタンパク質をコードするDNAは、上述したような本発明のタンパク質の *in vivo* や *in vitro*における生産に利用される他、例えば、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の異常に起因する疾患や本発明のタンパク質により治療可能な疾患の遺伝子治療などへの応用も考えられる。本発明のDNAは、本発明のタンパク質をコードしうるものであればいかなる形態でもよい。即ち、mRNAから合成されたcDNAであるか、ゲノムDNAであるか、化学合成DNAであるかなどを問わない。また、本発明のタンパク質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有するDNAが含まれる。

【0025】

本発明のDNAは、当業者に公知の方法により調製することができる。例えば、本発明のタンパク質を発現している細胞よりcDNAライブラリーを作製し、本発明のDNAの配列（例えば、配列番号：1）の一部をプローブにしてハイブリダイゼーションを行うことにより調製できる。cDNAライブラリーは、例えばSambrook, J. et al., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に記載の方法により調製してもよいし、市販のDNAライブラリーを用いてもよい。また、本発明のタンパク質を発現している細胞よりRNAを調製し、逆転写酵素によりcDNAを合成した後、本発明のDNAの配列（例えば、配列番号：1）に基づいてオリゴDNAを合成し、これをプライマーとして用いてPCR反応を行い、本発明のタンパク質をコードするcDNAを増幅させることにより調製することも可能である。

また、得られたcDNAの塩基配列を決定することにより、それがコードする翻訳

領域を決定でき、本発明のタンパク質のアミノ酸配列を得ることができる。また、得られたcDNAをプローブとしてゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、ゲノムDNAを単離することができる。

【0026】

具体的には、次のようにすればよい。まず、本発明のタンパク質を発現する細胞、組織、臓器(例えば脳、骨格筋、精巣、胎盤、大腸、脾臓、軟骨などの組織)から、mRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法(Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC法(Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159)等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia)等を使用して全RNAからmRNAを精製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia)を用いることによりmRNAを直接調製することもできる。

【0027】

得られたmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業)等を用いて行うこともできる。また、本明細書に記載されたプライマー等を用いて、5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech製)およびポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction; PCR)を用いた5'-RACE法(Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932)にしたがい、cDNAの合成および増幅を行うことができる。

【0028】

得られたPCR産物から目的とするDNA断片を調製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列は、公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法により確認することができる。

【0029】

また、本発明のDNAにおいては、発現に使用する宿主のコドン使用頻度を考慮

して、より発現効率の高い塩基配列を設計することができる (Grantham, R. et al., Nucleic Acids Research (1981) 9, r43-74)。また、本発明のDNAは、市販のキットや公知の方法によって改変することができる。改変としては、例えば、制限酵素による消化、合成オリゴヌクレオチドや適当なDNAフラグメントの挿入、リンカーの付加、開始コドン (ATG) 及び／又は終止コドン (TAA、TGA、又はTAG) の挿入等が挙げられる。

【0030】

本発明のDNAは、具体的には、配列番号：1の塩基配列において135位の塩基Aから1271位の塩基TからなるDNAを包含する。

【0031】

本発明のDNAはまた、配列番号：1に示す塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであり、且つ上記本発明のタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNAを含む。ハイブリダイゼーションにおけるストリンジェントな条件は、当業者であれば適宜選択することができるが、具体的には上記した条件を用いることができる。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有するDNAを得ることができる。上記のハイブリダイズするDNAは、好ましくは天然由来のDNA、例えばcDNA又は染色体DNAである。

【0032】

本発明は、また、本発明のDNAが挿入されたベクターを提供する。本発明のベクターとしては、宿主細胞内において本発明のDNAを保持したり、本発明のタンパク質を発現させるために有用である。

ベクターとしては、例えば、大腸菌を宿主とする場合には、ベクターを大腸菌 (例えば、JM109、DH5 α 、HB101、XL1Blue) などで大量に増幅させ大量調製するために、大腸菌で増幅されるための「ori」をもち、さらに形質転換された大腸菌の選抜遺伝子 (例えば、なんらかの薬剤 (アンピシリンやテトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール) により判別できるような薬剤耐性遺伝子) を有すれば特に制限はない。ベクターの例としては、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Scriptなどが挙げられる。また、cDNAのサブクローニング、切り出しを目的とした場合、上記ベクターの他に、例えば、pG

EM-T、pDIRECT、pT7などが挙げられる。本発明のタンパク質を生産する目的においてベクターを使用する場合には、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を持つほかに、宿主をJM109、DH5 α 、HB101、XL1-Blueなどの大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZプロモーター（Wardら，Nature（1989）341，544-546；FASEB J.（1992）6，2422-2427）、araBプロモーター（Betterら，Science（1988）240，1041-1043）、またはT7プロモーターなどを持っていることが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他にpGEX-5X-1（Pharmacia社製）、「QIAexpress system」（Qiagen社製）、pEGFP、またはpET（この場合、宿主はT7 RNAポリメラーゼを発現しているBL21が好ましい）などが挙げられる。

【0033】

また、ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。タンパク質分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列（Lei，S. P. et al J. Bacteriol.（1987）169，4379）を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。

【0034】

大腸菌以外にも、例えば、本発明のタンパク質を製造するためのベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター（例えば、pcDNA3（Invitrogen社製）や、pEGF-BOS（Nucleic Acids. Res.1990，18(17),p5322）、pEF、pCDM8）、昆虫細胞由来の発現ベクター（例えば「Bac-to-BAC baculovirus expression system」（GIBCO BRL社製）、pBacPAK8）、植物由来の発現ベクター（例えばpMH1、pMH2）、動物ウイルス由来の発現ベクター（例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw）、レトロウイルス由来の発現ベクター（例えば、pZIPneo）、酵母由来の発現ベクター（例えば、「Pichia Expression Kit」（Invitrogen社製）、pNV11、SP-Q01）、枯草菌由来の発現ベクター（例えば、pPL608、pKTH50）が挙げられる。

【0035】

CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えばSV40プロモーター (Mulliganら, Nature (1979) 277, 108)、MLLV-LTRプロモーター、EF1 α プロモーター (Mizushimaら, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322)、CMVプロモーターなどを持っていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子 (例えば、薬剤 (ネオマイシン、G418など) により判別できるような薬剤耐性遺伝子) を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13などが挙げられる。

【 0 0 3 6 】

さらに、遺伝子を安定的に発現させ、かつ、細胞内での遺伝子のコピー数の増幅を目的とする場合には、核酸合成経路を欠損したCHO細胞にそれを相補するDHFR遺伝子を有するベクター (例えば、pCHO1など) を導入し、メトトレキセート (MTX) により増幅させる方法が挙げられ、また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つCOS細胞を用いてSV40の複製起点を持つベクター (pcDなど) で形質転換する方法が挙げられる。複製開始点としては、また、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス (BPV) 等の由来のものを用いることもできる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

【 0 0 3 7 】

一方、動物の生体内で本発明のDNAを発現させる方法としては、本発明のDNAを適当なベクターに組み込み、例えば、レトロウイルス法、リポソーム法、カチオンリポソーム法、アデノウイルス法などにより生体内に導入する方法などが挙げられる。これにより、本発明の「DEC2」遺伝子の変異に起因する疾患に対する遺伝子治療を行うことが可能である。用いられるベクターとしては、例えば、アデノウイルスベクター (例えばpAdex1cw) やレトロウイルスベクター (例えばpZIPneo) などが挙げられるが、これらに制限されない。ベクターへの本発明のDN

Aの挿入などの一般的な遺伝子操作は、常法に従って行うことが可能である (Molecular Cloning, 5.61-5.63)。生体内への投与は、ex vivo法であっても、in vivo法であってもよい。

【0038】

また、本発明は、本発明のベクターが導入された宿主細胞に関する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、例えば、大腸菌や種々の動物細胞などを用いることが可能である。本発明の宿主細胞は、例えば、本発明のタンパク質の製造や発現のための産生系として使用することができる。タンパク質製造のための産生系は、in vitroおよびin vivoの産生系がある。in vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

【0039】

真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945)、COS、3T3、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340)、あるいは昆虫細胞、例えば、Sf9、Sf21、Tn5が知られている。CHO細胞としては、特に、DHFR遺伝子を欠損したCHO細胞であるdhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) やCHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) を好適に使用することができる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特にCHO細胞が好ましい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリボソームDOTAP (ペーリンガー・マンハイム社製) を用いた方法、エレクトロポレーション法、リポフェクションなどの方法で行うことが可能である。

【0040】

植物細胞としては、例えば、ニコチアナ・タバカム (Nicotiana tabacum) 由来の細胞がタンパク質生産系として知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (Saccharomyces) 属、例

例えば、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、例えば、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) が知られている。

【0041】

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、例えば、JM109、DH5 α 、HB101 等が挙げられ、その他、枯草菌が知られている。

【0042】

これらの細胞を目的とするDNAにより形質転換し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することによりタンパク質が得られる。培養は、公知の方法に従い行うことができる。例えば、動物細胞の培養液として、例えば、DMEM、MEM、RPMI 1640、IMDMを使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時のpHは、約6~8であるのが好ましい。培養は、通常、約30~40℃で約15~200時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

【0043】

一方、*in vivo* でタンパク質を産生させる系としては、例えば、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的とするDNAを導入し、動物又は植物の体内でタンパク質を産生させ、回収する。本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

【0044】

動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

【0045】

例えば、目的とするDNAを、ヤギ β カゼインのような乳汁中に固有に産生されるタンパク質をコードする遺伝子との融合遺伝子として調製する。次いで、この融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ移植する。

胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から、目的のタンパク質を得ることができる。トランスジェニックヤギから産生されるタンパク質を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

【0046】

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的のタンパク質をコードするDNAを挿入したバキュロウィルスをカイコに感染させることにより、このカイコの体液から目的のタンパク質を得ることができる (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。

【0047】

さらに、植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的とするタンパク質をコードするDNAを植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望のポリペプチドを得ることができる (Julian K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

【0048】

これにより得られた本発明のタンパク質は、宿主細胞内または細胞外（培地など）から単離し、実質的に純粋で均一なタンパク質として精製することができる。タンパク質の分離、精製は、通常のタンパク質の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせればタンパク質を分離、精製することができる。

【0049】

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロ

マトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。本発明は、これらの精製方法を用い、高度に精製されたタンパク質も包含する。

【0050】

なお、タンパク質を精製前又は精製後に適当なタンパク質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり部分的にペプチドを除去することもできる。タンパク質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼなどが用いられる。

【0051】

本発明は、また、本発明のタンパク質と結合する抗体を提供する。本発明の抗体の形態には、特に制限はなく、ポリクローナル抗体の他、モノクローナル抗体も含まれる。また、ウサギなどの免疫動物に本発明のタンパク質を免疫して得た抗血清、すべてのクラスのポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、さらにヒト抗体や遺伝子組み換えによるヒト型化抗体も含まれる。

【0052】

抗体取得の感作抗原として使用される本発明のタンパク質は、その由来となる動物種に制限されないが哺乳動物、例えばヒト、マウス又はラット由来のタンパク質が好ましく、特にヒト由来のタンパク質が好ましい。ヒト由来のタンパク質は、本明細書に開示される遺伝子配列又はアミノ酸配列を用いて得ることができる。

【0053】

本発明において、感作抗原として使用されるタンパク質は、完全なタンパク質であってもよいし、また、タンパク質の部分ペプチドであってもよい。タンパク質の部分ペプチドとしては、例えば、タンパク質のアミノ基 (N) 末端断片やカルボキシ (C) 末端断片が挙げられる。本明細書で述べる「抗体」とはタンパク質の全長又は断片に反応する抗体を意味する。

【 0 0 5 4 】

本発明のタンパク質又はその断片をコードする遺伝子を公知の発現ベクター系に挿入し、該ベクターで本明細書で述べた宿主細胞を形質転換させ、該宿主細胞内外から目的のタンパク質又はその断片を公知の方法で得て、これらを感じ作抗原として用いればよい。また、タンパク質を発現する細胞又はその溶解物あるいは化学的に合成した本発明のタンパク質を感じ作抗原として使用してもよい。短いペプチドは、キーホールリンペットヘモシアニン、ウシ血清アルブミン、卵白アルブミンなどのキャリアタンパク質と適宜結合させて抗原とすることが好ましい。

【 0 0 5 5 】

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的には、げっ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が使用される。

げっ歯目の動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。ウサギ目の動物としては、例えば、ウサギが使用される。霊長目の動物としては、例えば、サルが使用される。サルとしては、狭鼻下目のサル（旧世界ザル）、例えば、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等が使用される。

【 0 0 5 6 】

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。一般的方法としては、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は皮下に注射する。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものに対し、所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に投与する。さらに、その後、フロイント不完全アジュバントに適量混合した感作抗原を、4～21日毎に数回投与することが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを常法により確認する。

【 0 0 5 7 】

ここで、本発明のタンパク質に対するポリクローナル抗体を得るには、血清中

の所望の抗体レベルが上昇したことを確認した後、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出す。この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としては、ポリクローナル抗体を含む血清を使用してもよいし、必要に応じこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離して、これを使用してよい。例えば、本発明のタンパク質をカップリングさせたアフィニティーカラムを用いて、本発明のタンパク質のみを認識する画分を得て、さらにこの画分をプロテインAあるいはプロテインGカラムを利用して精製することにより、免疫グロブリンGあるいはMを調製することができる。

【0058】

モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物の血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を取り出し、細胞融合に付せばよい。この際、細胞融合に使用される好ましい免疫細胞として、特に脾細胞が挙げられる。前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としては、好ましくは哺乳動物のミエローマ細胞、より好ましくは、薬剤による融合細胞選別のための特性を獲得したミエローマ細胞が挙げられる。

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、例えば、ミルステインらの方法(Galfre, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

【0059】

細胞融合により得られたハイブリドーマは、通常を選択培養液、例えば、HAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常、数日～数週間継続して行う。次いで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングを行う。

【0060】

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球、例えばEBウィルスに感染したヒトリンパ球をin vitroでタンパク質、タンパク質発現細胞又はその溶解物で感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分

裂能を有するミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、タンパク質への結合活性を有する所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる（特開昭63-17688号公報）。

【0061】

次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のタンパク質をカップリングしたアフィニティーカラムなどにより精製することで調製することが可能である。本発明の抗体は、本発明のタンパク質の精製、検出に用いられる他、本発明のタンパク質のアゴニストやアンタゴニストの候補になる。また、この抗体を本発明のタンパク質が関与する疾患の抗体治療へ応用することも考えられる。得られた抗体を人体に投与する目的（抗体治療）で使用する場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト抗体やヒト型抗体が好ましい。

【0062】

例えば、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるタンパク質、タンパク質発現細胞又はその溶解物を免疫して抗体産生細胞を取得し、これをミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマを用いてタンパク質に対するヒト抗体を取得することができる（国際公開番号W092-03918、W093-2227、W094-02602、W094-25585、W096-33735およびW096-34096参照）。

ハイブリドーマを用いて抗体を産生する以外に、抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞を癌遺伝子（oncogene）により不死化させた細胞を用いてもよい。

【0063】

このように得られたモノクローナル抗体はまた、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体として得ることができる（例えば、Borrebaeck, C. A. K. and Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。組換え型抗体は、それをコードするDNAをハイブリドーマ又は抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させる。本発明は、この組換え型抗体を包含する。

【 0 0 6 4 】

さらに、本発明の抗体は、本発明のタンパク質に結合する限り、その抗体断片や抗体修飾物であってよい。例えば、抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv又はH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv) (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883) が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照）。

【 0 0 6 5 】

抗体修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本発明の「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

【 0 0 6 6 】

また、本発明の抗体は、公知の技術を使用して非ヒト抗体由来の可変領域とヒト抗体由来の定常領域からなるキメラ抗体又は非ヒト抗体由来のCDR（相補性決定領域）とヒト抗体由来のFR（フレームワーク領域）及び定常領域からなるヒト型化抗体として得ることができる。

【 0 0 6 7 】

前記のように得られた抗体は、均一にまで精製することができる。本発明で用いられる抗体の分離、精製は通常のタンパク質で用いられている分離、精製方法を使用すればよい。例えば、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグ

ラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる (Antibodies : A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) が、これらに限定されるものではない。上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定又は酵素結合免疫吸着検定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 等により行うことができる。

【0068】

アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。例えば、プロテインAカラムを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia) 等が挙げられる。

【0069】

アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization : A Laboratory Course Manual, Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーはHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

【0070】

また、本発明の抗体の抗原結合活性を測定する方法として、例えば、吸光度の測定、酵素結合免疫吸着検定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)、EIA (酵素免疫測定法)、RIA (放射免疫測定法) あるいは蛍光抗体法を用いることができる。ELISAを用いる場合、本発明の抗体を固相化したプレートに本発明のタンパク質を添加し、次いで目的の抗体を含む試料、例えば、抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。酵素、例えば、アルカリフォスファターゼ等で標識した抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートをインキュベーションし、次いで洗浄した後、p-ニトロフェニルリン酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定

することで抗原結合活性を評価することができる。タンパク質としてタンパク質の断片、例えばそのC末端からなる断片を使用してもよい。本発明の抗体の活性評価には、BIAcore(Pharmacia製)を使用することができる。

【0071】

これらの手法を用いることにより、本発明の抗体と試料中に含まれる本発明のタンパク質が含まれると予想される試料とを接触せしめ、該抗体と該タンパク質との免疫複合体を検出又は測定することからなる、本発明のタンパク質の検出又は測定方法を実施することができる。本発明のタンパク質の検出又は測定方法は、タンパク質を特異的に検出又は測定することができるため、タンパク質を用いた種々の実験等に有用である。

【0072】

本発明はまた、ヒト「DEC2」タンパク質をコードするDNA（配列番号：1）またはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含むDNAを提供する。

ここで「相補鎖」とは、A:T、G:Cの塩基対からなる2本鎖DNAの一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。

【0073】

このようなDNAには、本発明のタンパク質をコードするDNAの検出や増幅に用いるプローブやプライマー、本発明のタンパク質の発現を抑制するためのヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイムをコードするDNA等）が含まれる。また、このようなDNAは、DNAチップの作製に利用することもできる。

プライマーとして用いる場合、3'側の領域は相補的とし、5'側には制限酵素認識配列やタグなどを付加することができる。

【0074】

アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、例えば、配列番号：1の塩基配列

中のいずれかの箇所にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは配列番号：1の塩基配列中の連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。さらに好ましくは、連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドが翻訳開始コドンを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0075】

アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、それらの誘導体や修飾体を使用することができる。修飾体として、例えばメチルホスホネート型又はエチルホスホネート型のような低級アルキルホスホネート修飾体、ホスホロチオエート修飾体又はホスホロアミデート修飾体等が挙げられる。

【0076】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNA又はmRNAの所定の領域を構成するヌクレオチドに対応するヌクレオチドが全て相補配列であるもののみならず、DNAまたはmRNAとオリゴヌクレオチドとが配列番号：1に示される塩基配列に特異的にハイブリダイズできる限り、1又は複数個のヌクレオチドのミスマッチが存在していてもよい。

【0077】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、本発明のタンパク質の産生細胞に作用して、該タンパク質をコードするDNA又はmRNAに結合することにより、その転写又は翻訳を阻害したり、mRNAの分解を促進したりして、本発明のタンパク質の発現を抑制することにより、結果的に本発明のタンパク質の作用を抑制する効果を有する。

【0078】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、それらに対して不活性な適当な基剤と混和して塗布剤、パップ剤等の外用剤とすることができる。

【0079】

また、必要に応じて、賦形剤、等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、無痛化剤等を加えて錠剤、散財、顆粒剤、カプセル剤、リポソームカプセル剤、注射剤、液剤、点鼻剤など、さらに凍結乾燥剤とすることができる。これらは常法

にしたがって調製することができる。

【0080】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は患者の患部に直接適用するか、又は血管内に投与するなどして結果的に患部に到達し得るように患者に適用する。さらには、持続性、膜透過性を高めるアンチセンス封入素材を用いることもできる。例えば、リポソーム、ポリ-L- リジン、リピッド、コレステロール、リポフェクチン又はこれらの誘導体が挙げられる。

【0081】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体の投与量は、患者の状態に応じて適宜調整し、好ましい量を用いることができる。例えば、0.1 ～100mg/kg、好ましくは0.1 ～50mg/kg の範囲で投与することができる。

【0082】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは本発明のタンパク質の発現を阻害し、従って本発明のタンパク質の生物学的活性を抑制することにおいて有用である。また、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する発現阻害剤は、本発明のタンパク質の生物学的活性を抑制することが可能である点で有用である。

【0083】

本発明の蛋白質は、これに結合する化合物のスクリーニングに有用である。すなわち、本発明の蛋白質と、該蛋白質に結合する化合物を含むと予想される被検試料とを接触せしめ、そして本発明の蛋白質に結合する活性を有する化合物を選択する、ことからなる本発明の蛋白質に結合する化合物をスクリーニングする方法において使用される。

【0084】

スクリーニングに用いられる本発明のタンパク質は組換えタンパク質であっても、天然由来のタンパク質であってもよい。また部分ペプチドであってもよい。また細胞表面に発現させた形態、または膜画分としての形態であってもよい。被検試料としては特に制限はなく、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、精製若しくは粗精製タンパク質、ペプ

チド、非ペプチド性化合物、合成低分子化合物、天然化合物が挙げられる。被検試料を接触させる本発明のタンパク質は、例えば、精製したタンパク質として、可溶型タンパク質として、担体に結合させた形態として、他のタンパク質との融合タンパク質として、細胞膜上に発現させた形態として、膜画分として被検試料に接触させることができる。

【0085】

本発明のタンパク質を用いて、例えば該タンパク質に結合するタンパク質（例えば他のbHLH型転写因子や転写調節に関連する他のタンパク質など）をスクリーニングする方法としては、当業者に公知の多くの方法を用いることが可能である。このようなスクリーニングは、例えば、免疫沈降法により行うことができる。具体的には、以下のように行うことができる。本発明のタンパク質をコードする遺伝子を、pSV2neo, pcDNA 1, pCD8 などの外来遺伝子発現用のベクターに挿入することで動物細胞などで当該遺伝子を発現させる。発現に用いるプロモーターとしては SV40 early promoter (Rigby In Williamson (ed.), Genetic Engineering, Vol.3. Academic Press, London, p.83-141(1982)), EF-1 α promoter (Kimら Gene 91, p.217-223 (1990)), CAG promoter (Niwa et al. Gene 108, p.193-200 (1991)), RSV LTR promoter (Cullen Methods in Enzymology 152, p.684-704 (1987)), SR α promoter (Takebe et al. Mol. Cell. Biol. 8, p.466 (1988)), CMV immediate early promoter (Seed and Aruffo Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, p.3365-3369 (1987)), SV40 late promoter (Gheysen and Fiers J. Mol. Appl. Genet. 1, p.385-394 (1982)), Adenovirus late promoter (Kaufman et al. Mol. Cell. Biol. 9, p. 946 (1989)), HSV TK promoter 等の一般的に使用できるプロモーターであれば何を用いてもよい。動物細胞に遺伝子を導入することで外来遺伝子を発現させるためには、エレクトロポレーション法 (Chu, G. et al. Nucl. Acid Res. 15, 1311-1326 (1987)), リン酸カルシウム法 (Chen, C and Okayama, H. Mol. Cell. Biol. 7, 2745-2752 (1987)), DEAE デキストラン法 (Lopata, M. A. et al. Nucl. Acids Res. 12, 5707-5717 (1984)); Sussman, D. J. and Milman, G. Mol. Cell. Biol. 4, 1642-1643 (1985))、リポフェクチン法 (Derijard, B. Cell 7, 1025-1037 (1994); Lamb, B. T. e

t al. *Nature Genetics* 5, 22-30 (1993); Rabindran, S. K. et al. *Science* 259, 230-234 (1993))等の方法があるが、いずれの方法によってもよい。特異性の明らかとなっているモノクローナル抗体の認識部位（エピトープ）を本発明のタンパク質のN 末または C末に導入することにより、モノクローナル抗体の認識部位を有する融合タンパク質として本発明のタンパク質を発現させることができる。用いるエピトープ-抗体系としては市販されているものを利用することができる（*実験医学* 13, 85-90 (1995)）。マルチクローニングサイトを介して、 β -ガラクトシダーゼ、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP）などとの融合タンパク質を発現することができるベクターが市販されている。

【0086】

融合タンパク質にすることにより本発明のタンパク質の性質をできるだけ変化させないようにするために数個から十数個のアミノ酸からなる小さなエピトープ部分のみを導入して、融合タンパク質を調製する方法も報告されている。例えば、ポリヒスチジン（His-tag）、インフルエンザ凝集素 HA、ヒトc-myc、FLAG、Vesicular stomatitis ウイルス糖タンパク質（VSV-GP）、T7 gene10 タンパク質（T7-tag）、ヒト単純ヘルペスウイルス糖タンパク質（HSV-tag）、E-tag（モノクローナルファージ上のエピトープ）などのエピトープとそれを認識するモノクローナル抗体を、本発明のタンパク質に結合するタンパク質のスクリーニングのためのエピトープ-抗体系として利用できる（*実験医学* 13, 85-90 (1995)）。

【0087】

免疫沈降においては、これらの抗体を、適当な界面活性剤を利用して調製した細胞溶解液に添加することにより免疫複合体を形成させる。この免疫複合体は本発明のタンパク質、それと結合能を有するタンパク質、および抗体からなる。上記エピトープに対する抗体を用いる以外に、本発明のタンパク質に対する抗体を利用して免疫沈降を行うことも可能である。本発明のタンパク質に対する抗体は、例えば、本発明のタンパク質をコードする遺伝子を適当な大腸菌発現ベクターに導入して大腸菌内で発現させ、発現させたタンパク質を精製し、これをウサギやマウス、ラット、ヤギ、ニワトリなどに免疫することで調製することができる。

。また、合成した本発明のタンパク質の部分ペプチドを上記の動物に免疫することによって調製することもできる。

【0088】

免疫複合体は、例えば、抗体がマウス IgG 抗体であれば、Protein A Sepharose や Protein G Sepharose を用いて沈降させることができる。また、本発明のタンパク質を、例えば、GSTなどのエピトープとの融合タンパク質として調製した場合には、グルタチオン-Sepharose 4Bなどのこれらエピトープに特異的に結合する物質を利用して、本発明のタンパク質の抗体を利用した場合と同様に、免疫複合体を形成させることができる。

免疫沈降の一般的な方法については、例えば、文献 (Harlow, E. and Lane, D. : Antibodies, pp.511-552, Cold Spring Harbor Laboratory publications, New York (1988)) 記載の方法に従って、または準じて行えばよい。

【0089】

免疫沈降されたタンパク質の解析には SDS-PAGE が一般的であり、適当な濃度のゲルを用いることでタンパク質の分子量により結合していたタンパク質を解析することができる。また、この際、一般的には本発明のタンパク質に結合したタンパク質は、クマシー染色や銀染色といったタンパク質の通常の染色法では検出することは困難であるので、放射性同位元素である ^{35}S -メチオニンや ^{35}S -システインを含んだ培養液で細胞を培養し、該細胞内のタンパク質を標識して、これを検出することで検出感度を向上させることができる。タンパク質の分子量が判明すれば直接 SDS-ポリアクリルアミドゲルから目的のタンパク質を精製し、その配列を決定することもできる。

【0090】

また、本発明のタンパク質を用いて、該タンパク質に結合するタンパク質を単離する方法としては、例えば、ウエストウエスタンブロッティング法 (Skolnik, E. Y. et al., Cell (1991) 65, 83-90) を用いて行うことができる。すなわち、本発明のタンパク質と結合する結合タンパク質を発現していることが予想される細胞、組織、臓器 (例えば脳、骨格筋、精巣、胎盤、大腸、脾臓、軟骨などの組織や培養細胞など) よりファージベクター (λ gt11, ZAP など) を用いた cDNA

ライブラリーを作製し、これをLB-アガロース上で発現させフィルターに発現させたタンパク質を固定し、精製して標識した本発明のタンパク質と上記フィルターとを反応させ、本発明のタンパク質と結合したタンパク質を発現するブランクを標識により検出すればよい。本発明のタンパク質を標識する方法としては、ビオチンとアビジンの結合性を利用する方法、本発明のタンパク質又は本発明のタンパク質に融合したペプチド又はポリペプチド（例えばGSTなど）に特異的に結合する抗体を利用する方法、ラジオアイソトープを利用する方法又は蛍光を利用する方法等が挙げられる。

【 0 0 9 1 】

また、本発明のスクリーニング方法の他の態様としては、細胞を用いた 2-ハイブリッドシステム (Fields, S., and Sternglanz, R., Trends. Genet. (1994) 10, 286-292, Dalton S, and Treisman R (1992) Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. Cell 68, 597-612, 「MATCHMARKER Two-Hybrid System」, 「Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit」, 「MATCHMAKER One-Hybrid System」 (いずれもClontech社製)、 「HybriZAP Two-Hybrid Vector System」 (Stratagene社製)) を用いて行う方法が挙げられる。2-ハイブリッドシステムにおいては、本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをSRF DNA結合領域またはGAL4 DNA結合領域と融合させて酵母細胞の中で発現させ、本発明のタンパク質と結合するタンパク質を発現していることが予想される細胞より、VP16またはGAL4転写活性化領域と融合する形で発現するようなcDNAライブラリーを作製し、これを上記酵母細胞に導入し、検出された陽性クローンからライブラリー由来cDNAを単離する（酵母細胞内で本発明のタンパク質と結合するタンパク質が発現すると、両者の結合によりレポーター遺伝子が活性化され、陽性のクローンが確認できる）。単離したcDNAを大腸菌に導入して発現させることにより、該cDNAがコードするタンパク質を得ることができる。これにより本発明のタンパク質に結合するタンパク質またはその遺伝子を調製することが可能である。2-ハイブリッドシステムにおいて用いられるレポーター遺伝子としては、例えば、HIS3遺伝子の他、Ade2遺伝子、LacZ遺伝子、CAT遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、PAI-1 (Plasminogen activa

tor inhibitor type1) 遺伝子等が挙げられるが、これらに制限されない。

【0092】

本発明のタンパク質と結合する化合物のスクリーニングは、アフィニティークロマトグラフィーを用いて行うこともできる。例えば、本発明のタンパク質をアフィニティーカラムの担体に固定し、ここに本発明のタンパク質と結合するタンパク質を発現していることが予想される被検試料を適用する。この場合の被検試料としては、例えば細胞抽出物、細胞溶解物等が挙げられる。被検試料を適用した後、カラムを洗浄し、本発明のタンパク質に結合したタンパク質を調製することができる。

【0093】

得られたタンパク質は、そのアミノ酸配列を分析し、それを基にオリゴDNAを合成し、該DNAをプローブとしてcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、該タンパク質をコードするDNAを得ることができる。

【0094】

本発明において、結合した化合物を検出又は測定する手段として表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーを使用することもできる。表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーは、本発明のタンパク質と被検化合物との間の相互作用を微量のタンパク質を用いてかつ標識することなく、表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することが可能である（例えばBIAcore、Pharmacia製）。したがって、BIAcore等のバイオセンサーを用いることにより本発明のタンパク質と被検化合物との結合を評価することが可能である。

【0095】

また、タンパク質に限らず、本発明のタンパク質に結合する化合物（アゴニスト、およびアンタゴニストを含む）を単離する方法としては、例えば、固定した本発明のタンパク質に、合成化合物、天然物バンク、もしくはランダムファージペプチドディスプレイライブラリーを作用させ、本発明のタンパク質に結合する分子をスクリーニングする方法や、コンビナトリアルケミストリー技術によるハイスループットを用いたスクリーニング方法（Wrighton NC; Farrell FX; Chang R; Kashyap AK; Barbone FP; Mulcahy LS; Johnson DL; Barrett RW; Jolliffe

LK; Dower WJ., Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin, Science (UNITED STATES) Jul 26 1996, 273 p458-64, Verdin e GL., The combinatorial chemistry of nature. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p11-13, Hogan JC Jr., Directed combinatorial chemistry. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p17-9) が当業者に公知である。

【 0 0 9 6 】

本発明のタンパク質に結合する化合物は、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害するための薬剤の候補となり、本発明のタンパク質の発現異常や機能異常などに起因する疾患や本発明の蛋白質の活性を制御することにより治療可能な疾患の治療への応用が考えられる。本発明のスクリーニング方法を用いて得られる、本発明のタンパク質に結合する活性を有する化合物の構造の一部を、付加、欠失及び／又は置換により変換される物質も、本発明のタンパク質に結合する化合物に含まれる。

【 0 0 9 7 】

本発明のタンパク質に結合する化合物や本発明のタンパク質をヒトや哺乳動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、マントヒヒ、チンパンジーの医薬として使用する場合には、タンパク質や単離された化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

【 0 0 9 8 】

錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、

コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

【0099】

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80 (TM)、HCO-50と併用してもよい。

【0100】

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

【0101】

患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、経皮的、または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物がDNAによりコードされうるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

【0102】

本発明のタンパク質の投与量は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約100 μ gから20mgであると考えられる。

【0103】

本発明のタンパク質と結合する化合物や本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物の投与量は、症状により差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.1から100mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgである。

【0104】

非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.01から30mg、好ましくは約0.1から20mg、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量、あるいは体表面積あたりに換算した量を投与することができる。

【0105】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0106】

【実施例】

【実施例1】 新規なDEC1サブファミリー遺伝子 DEC2 の単離

DEC1 cDNAコーディング領域の全塩基配列を用いて、ヒトESTデータベースよりDEC1と類似性のあるcDNA断片を検索した。検索された数種類のcDNA断片の内、一種類について3' RACE、5' RACE法により全長のcDNA塩基配列を決定した。

一段回目PCRの鋳型として、1 μ gのヒト膝軟骨細胞由来 cDNA ライブラリー（CLONTECH社製）を用いた。PCRは全容量 50 μ lで、LA taq（TaKaRa社製）を用い、400 μ M の各dNTP、0.2 μ M 各プライマーで「94℃で 1分」を1回、次いで「98℃で 20秒および68℃で 3分」を30回、次いで「72℃で 5分」を1回の条件で行った。その後、反応液の1/25希釈液 5 μ lを2段回目PCRの鋳型として用い、一段回目

と同様の条件で反応を行った。プライマーは 5' RACE 一段回目において ACT2-5' (5'-CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC-3' / 配列番号: 3) と 3' 006A (5'-GCAAGTGGTTGATCAGCTGGACACA-3' / 配列番号: 4)、二段階目において ACT2-B (5'-GCTTACCCATACGATGTTCCA-3' / 配列番号: 5) と 5' 006A (5'-TGGAACGCATCCAAGTCGGACTGAAT-3' / 配列番号: 6)、3' RACE 一段回目において 065' S2 (5'-TTGAACATGGACGAAGGAATTCC-3' / 配列番号: 7) と ACT2-3' (5'-GAGATGGTGCACGATGCACAGTTGAAGTGAAC-3' / 配列番号: 8)、二段階目において 5' 006S (5'-ATTCAGTCGACTTGGATGCGTTCCA-3' / 配列番号: 9) と ACT2-3' 2 (5'-GCGGGGTTTTTCAGTATCTACGA-3' / 配列番号: 10) を使用した。

二段回目のPCR産物を1%アガロースゲル電気泳動で分離し、バンドをゲルから切り出し、GENECLEAN II kit (BIO 101社製) でDNAフラグメントを抽出した。得られたDNAフラグメントをTAクローニングによりpGEM-T Easy vector (Promega社製) に組み込み、クローンを単離後、プラスミドを精製し、シーケンスに使用した。シーケンスは BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Applied Biosystems社製) で反応を行った後、ABI PRISM 310 DNA Analyzer (PE Applied Biosystems社製) を用いて解析した。少なくとも3つの独立したPCR反応から得られたクローンをシーケンスし、塩基配列を決定した。

これにより同定されたDEC1サブファミリー遺伝子をDEC2と名付けた。決定されたDEC2 cDNAの塩基配列を配列番号: 1に、該cDNAによりコードされる蛋白質のアミノ酸配列を配列番号: 2に示す。

【0107】

〔実施例2〕 DEC2 の構造解析

DEC2 cDNA の塩基配列は、379アミノ酸からなるタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを有していた。該タンパク質は塩基性ヘリックス-ループヘリックス (basic Helix-Loop-Helix; bHLH) 構造を有しており、bHLH型の転写因子であると考えられる (図1)。DEC1タンパク質とのアラインメント解析では、特にbHLH領域においてアミノ酸配列の高い類似性が見出された (図2)。DEC2タンパク質は、ラット SHARPタンパク質のアミノ酸と最も高い相同性を示し、特にbHLH領域を含むN半側において、その相同性は高かった (図3)。し

かしC半側の領域の相同性は比較的低いことが判明した。

【0108】

【発明の効果】

本発明により、新規なbHLH型転写因子および該タンパク質をコードする遺伝子
が提供された。該遺伝子は細胞や組織の分化や増殖に関与していると考えられる
ことから、これらの細胞機能を制御するための因子として利用されうる。また、
発生や細胞増殖に関わる新たな因子の精製やクローニング、さらには生体内の発
現調節異常により本発明の遺伝子発現が異常となることにより起こる様々な疾病
に対する医薬品開発のためのツールとして利用することが可能である。本発明の
遺伝子をターゲットにした薬剤等を設計することにより、新たな作用機序による
医薬品の開発が可能であると考えられる。

【0109】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> DEC2, a Nobel Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Gene

<130> C1-107

<140>

<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 3274

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (135)..(1271)

<400> 1

ctgcactgaa gagggagagc gagagagaga ctggagacgc acagatcccc ccaaggtctc 60

ccaagcctac cgtcccacag attattgtac agagcccca aaatcgaaac agaggaaacg 120

aacagcagtt gaac atg gac gaa gga att cct cat ttg caa gag aga cag 170

Met Asp Glu Gly Ile Pro His Leu Gln Glu Arg Gln

1

5

10

tta ctg gaa cat aga gat ttt ata gga ctg gac tat tcc tct ttg tat 218

Leu Leu Glu His Arg Asp Phe Ile Gly Leu Asp Tyr Ser Ser Leu Tyr

15

20

25

atg tgt aaa ccc aaa agg agc atg aaa cga gac gac acc aag gat acc 266

Met Cys Lys Pro Lys Arg Ser Met Lys Arg Asp Asp Thr Lys Asp Thr

30

35

40

tac aaa tta ccg cac aga tta ata gaa aag aaa aga aga gac cga att 314

Tyr Lys Leu Pro His Arg Leu Ile Glu Lys Lys Arg Arg Asp Arg Ile

45

50

55

60

aat gaa tgc att gct cag ctg aaa gat tta ctg cct gaa cat ctg aaa 362

Asn Glu Cys Ile Ala Gln Leu Lys Asp Leu Leu Pro Glu His Leu Lys

65

70

75

ttg aca act ctg gga cat ctg gag aaa gct gta gtc ttg gaa tta act 410

Leu Thr Thr Leu Gly His Leu Glu Lys Ala Val Val Leu Glu Leu Thr

80

85

90

ttg aaa cac tta aaa gct tta acc gcc tta acc gag caa cag cat cag 458

Leu Lys His Leu Lys Ala Leu Thr Ala Leu Thr Glu Gln Gln His Gln

95

100

105

aag ata att gct tta cag aat ggg gag cga tct ctg aaa tcg ccc att 506

Lys Ile Ile Ala Leu Gln Asn Gly Glu Arg Ser Leu Lys Ser Pro Ile

110

115

120

cag tcc gac ttg gat gcg ttc cac tcg gga ttt caa aca tgc gcc aaa 554

Gln Ser Asp Leu Asp Ala Phe His Ser Gly Phe Gln Thr Cys Ala Lys

125

130

135

140

gaa gtc ttg caa tac ctc tcc cgg ttt gag agc tgg aca ccc agg gag 602

Glu Val Leu Gln Tyr Leu Ser Arg Phe Glu Ser Trp Thr Pro Arg Glu

145

150

155

ccg cgg tgt gtc cag ctg atc aac cac ttg cac gcc gtg gcc acc cag 650

Pro Arg Cys Val Gln Leu Ile Asn His Leu His Ala Val Ala Thr Gln

160

165

170

ttc ttg ccc acc ccg cag ctg ttg act caa cag gtc cct ctg agc aaa 698

Phe Leu Pro Thr Pro Gln Leu Leu Thr Gln Gln Val Pro Leu Ser Lys

175

180

185

ggc acc ggc gct ccc tcg gcc gcc ggg tcc gcg gcc gcc ccc tgc ctg 746

Gly Thr Gly Ala Pro Ser Ala Ala Gly Ser Ala Ala Ala Pro Cys Leu

190

195

200

gag cgc gcg ggg cag aag ctg gag ccc ctc gcc tac tgc gtg ccc gtc 794

Glu Arg Ala Gly Gln Lys Leu Glu Pro Leu Ala Tyr Cys Val Pro Val

205

210

215

220

atc cag cgg act cag ccc agc gcc gag ctc gcc gcc gag aac gac acg 842

Ile Gln Arg Thr Gln Pro Ser Ala Glu Leu Ala Ala Glu Asn Asp Thr

225

230

235

gac acc gac agc ggc tac ggc ggc gaa gcc gag gcc cgg ccg gac cgc 890

Asp Thr Asp Ser Gly Tyr Gly Gly Glu Ala Glu Ala Arg Pro Asp Arg

240

245

250

gag aaa ggc aaa ggc gcg ggg gcg agc cgc gtc acc atc aag cag gag 938

Glu Lys Gly Lys Gly Ala Gly Ala Ser Arg Val Thr Ile Lys Gln Glu

255

260

265

cct ccc ggg gag gac tcg ccg gcg ccc aag agg atg aag ctg gat tcg 986

Pro Pro Gly Glu Asp Ser Pro Ala Pro Lys Arg Met Lys Leu Asp Ser

270

275

280

ccg ccg ccg ccg cgt tcc cct gcc tgt cct cgg tgt tgt cgc ccc ctc 1034

Pro Pro Pro Pro Arg Ser Pro Ala Cys Pro Arg Cys Cys Arg Pro Leu
285 290 295 300

ccg aga agg cgg gcg ccg ccg cga ccc tcc tgc cgc acg agg tgg 1082
Pro Arg Arg Arg Ala Pro Pro Pro Arg Pro Ser Cys Arg Thr Arg Trp
305 310 315

cgc ccc ttg ggg cgc cgc acc ccc agc acc cgc acg gcc gca ccc acc 1130
Arg Pro Leu Gly Arg Arg Thr Pro Ser Thr Arg Thr Ala Ala Pro Thr
320 325 330

tgc cct tcg ccg ggc ccc gcg agc cgg gga acc cgg aga gct ctg ctc 1178
Cys Pro Ser Pro Gly Pro Ala Ser Arg Gly Thr Arg Arg Ala Leu Leu
335 340 345

agg aag atc cct cgc agc cag gaa agg aag ctc cct gaa tcc ttg cgt 1226
Arg Lys Ile Pro Arg Ser Gln Glu Arg Lys Leu Pro Glu Ser Leu Arg
350 355 360

ccc gaa gga cgg agg ttc aag cag agt gag aag tta aaa tac cct 1271
Pro Glu Gly Arg Arg Phe Lys Gln Ser Glu Lys Leu Lys Tyr Pro
365 370 375

taaggagggtt caagcagagt gagaagttaa aataccctta aggtctttta gggaggaagt 1331

gtaatagatg cagcagaggc ataaacaaga acaacaaaac aggtgttatg tgtacattcg 1391

gagttcctgt ttgtctcatc ccgcaccacc ccaccctcca cacactaaca tccctttctt 1451

ccccccacca gctgtaaaag atcctatgcg aaagacactg gctctttttt ttaatcccc 1511

aaataaattt tgcccccttt taggccatgt tccattatct cttaaaattg gaacctaat 1571

cgagaggaag taagaagggt ctgttctgtg gctgagctag gtgaaccccg gggtagggga 1631

aagatgttaa caccittgac gtctttggag ttgacatgga acagcaggta gttgttatgt 1691

agagctagtt ctcaaagctg ccctgcctgt tttaggaggc gttccacaaa cagattgagg 1751

ctcttttttag aattgaattt actcttcagt attttcta atgttcagcttt ctaaaaggca 1811

tatatatttc aaagaagtga ggatgcagtt tctcacgttg caacctattc tgaagtgggt 1871

taaatggat ctcttagtaa ctgacactcg ttaaagaaac acggagctgg gccatcgta 1931

gaactaagtc aggggaaggag atggatgaga aggccagaat cattcctagt acatttgcta 1991

acactttatt gagaaattga ccatgaatta atggactcat cttaatttct tctaagtcca 2051

tatatagata gatattctatc tgtacagatt tctatttctc catagatagg tatctataca 2111

tacacatctc aagtgcattt attcccactc tcattaatcc atcatgttcc taaatttttg 2171

taatcttact gtaaaaaaaaa gtgcactgaa ctccaaca aaacaaaaaa caacaacaac 2231

aaaaaacaag tccaaactga tatatcctat attctgttaa aattcaaaag tgaacgaaag 2291

catttaactg gccagttttg attgcaaatg ctgtaaagat atagaatgaa gtcctgtgag 2351

gccttcctat ctccaagtct atgtattttc tggagaccaa accagatacc agataatcac 2411

aaagaaagct tttttaataa ggcttaaacc aagacctgtg ctagatattt ttagtttggt 2471

gccaaagtag cactgtgaga aatctcactt ggatgttatg taaggggtga gacacaacag 2531

tctgactatg agtgaggaaa atatctgggt cttttcgtca gtttggtgca tttgctgctg 2591

ctgttgctac tgtttgcctc aaacgctgtg tttaaacaac gttaaactct tagcctacaa 2651

ggtggctctt atgtacatag ttgttaatac atccaattaa tgatgtctga catgctattt 2711

ttgtaggag aaaatatgtg ctaatgatat tttaggttaa aatatctttt ggggaggatt 2771

tgctgaaaag ttgcactttt gttacaatgc ttatgcttgg tacaagctta tgctgtctta 2831

aattatttta aaaaaattaa atactgtctg tgagaaacca gctggtttag aaaagtttag 2891

tatgtgacga taaactagaa attaccttta tattctagta ttttcagcac tccataaatt 2951

ctattaccta aatattgcca cactattttg tgatttaaaa attcttacta aggaataaaa 3011

actttaatat acgatatgat attgtctaataa aattaaaaaa gacataatgg atgctcaatt 3071

agttttaaga tatctataac tatagggata caaatcacta cagttctcag atttacacct 3131

tttttttgct attggcttga tgtcacacat ttccaatctc ttgcaagcct ccaggctctg 3191

gctttgtcta cctgctcggtt cccaatgtat cttaatgaaa agtgcaaaaag aaaaacctac 3251

caattaaaaa aaaaaaaaaa aaa

3274

<210> 2

<211> 379

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asp Glu Gly Ile Pro His Leu Gln Glu Arg Gln Leu Leu Glu His

1

5

10

15

Arg Asp Phe Ile Gly Leu Asp Tyr Ser Ser Leu Tyr Met Cys Lys Pro

20

25

30

Lys Arg Ser Met Lys Arg Asp Asp Thr Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Pro

35

40

45

His Arg Leu Ile Glu Lys Lys Arg Arg Asp Arg Ile Asn Glu Cys Ile

50

55

60

Ala Gln Leu Lys Asp Leu Leu Pro Glu His Leu Lys Leu Thr Thr Leu

65

70

75

80

Gly His Leu Glu Lys Ala Val Val Leu Glu Leu Thr Leu Lys His Leu

85

90

95

Lys Ala Leu Thr Ala Leu Thr Glu Gln Gln His Gln Lys Ile Ile Ala
 100 105 110

Leu Gln Asn Gly Glu Arg Ser Leu Lys Ser Pro Ile Gln Ser Asp Leu
 115 120 125

Asp Ala Phe His Ser Gly Phe Gln Thr Cys Ala Lys Glu Val Leu Gln
 130 135 140

Tyr Leu Ser Arg Phe Glu Ser Trp Thr Pro Arg Glu Pro Arg Cys Val
 145 150 155 160

Gln Leu Ile Asn His Leu His Ala Val Ala Thr Gln Phe Leu Pro Thr
 165 170 175

Pro Gln Leu Leu Thr Gln Gln Val Pro Leu Ser Lys Gly Thr Gly Ala
 180 185 190

Pro Ser Ala Ala Gly Ser Ala Ala Ala Pro Cys Leu Glu Arg Ala Gly
 195 200 205

Gln Lys Leu Glu Pro Leu Ala Tyr Cys Val Pro Val Ile Gln Arg Thr
 210 215 220

Gln Pro Ser Ala Glu Leu Ala Ala Glu Asn Asp Thr Asp Thr Asp Ser
 225 230 235 240

Gly Tyr Gly Gly Glu Ala Glu Ala Arg Pro Asp Arg Glu Lys Gly Lys
 245 250 255

Gly Ala Gly Ala Ser Arg Val Thr Ile Lys Gln Glu Pro Pro Gly Glu
260 265 270

Asp Ser Pro Ala Pro Lys Arg Met Lys Leu Asp Ser Pro Pro Pro Pro
275 280 285

Arg Ser Pro Ala Cys Pro Arg Cys Cys Arg Pro Leu Pro Arg Arg Arg
290 295 300

Ala Pro Pro Pro Arg Pro Ser Cys Arg Thr Arg Trp Arg Pro Leu Gly
305 310 315 320

Arg Arg Thr Pro Ser Thr Arg Thr Ala Ala Pro Thr Cys Pro Ser Pro
325 330 335

Gly Pro Ala Ser Arg Gly Thr Arg Arg Ala Leu Leu Arg Lys Ile Pro
340 345 350

Arg Ser Gln Glu Arg Lys Leu Pro Glu Ser Leu Arg Pro Glu Gly Arg
355 360 365

Arg Phe Lys Gln Ser Glu Lys Leu Lys Tyr Pro
370 375

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 3

ctattcgatg atgaagatac cccaccaaac cc

32

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

gcaagtgggtt gatcagctgg acaca

25

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 5

gcttaccat acgatgttc a

21

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

tggaacgcat ccaagtcgga ctgaat

26

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 7

ttgaacatgg acgaaggaat tcc

23

<210> 8

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 8

gagatggtgc acgatgcaca gttgaagtga ac

32

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 9

attcagtcgc acttgatgc gttcca

26

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 10

gcgggggtttt tcagtatcta cga

23

【図面の簡単な説明】

【図 1】

ヒトDEC2 cDNA の塩基配列およびこのcDNAによりコードされるヒトDEC2タンパク質のアミノ酸配列を示す図である。塩基性ドメイン (basic)、3つのヘリックスドメイン (Helix-1, Helix-2, Helix-3)、およびループ構造 (Loop) を下線で示した。また、ポリアデニレーションシグナルと一致する配列をドットで示した。

【図 2】

ヒトDEC2とヒトDEC1とのアミノ酸配列のアライメントを示す図である。

【図 3】

ヒトDEC2とラットSHARP1とのアミノ酸配列のアライメントを示す図である。

【書類名】 図面

【図 1】

CTGCACTGAAGAGG -120

AGAGCGAGAGAGACTGGAGACGCACAGATCCCCCAAGGTCTCCCAAGCTACCGTCCACAGATTATTGTACAGAGCCCCAAAAATCGAAACAGAGGAACGAACAGCAGTTGAAC -1

ATG GAC GAA GGA ATT CCT CAT TTG CAA GAG AGA CAG TTA CTG GAA CAT AGA GAT TTT ATA GGA CTG GAC TAT TCC TCT TTG TAT ATG TGT 90
Met Asp Glu Gly Ile Pro His Leu Gln Glu Arg Gln Leu Leu Glu His Arg Asp Phe Ile Gly Leu Asp Tyr Ser Ser Leu Tyr Met Cys 30

AAA CCC AAA AGG AGC ATG AAA CGA GAC GAC ACC AAG CAT ACC TAC AAA TTA CCG CAC AGA TTA ATA GAA AAG AAA AGA AGA GAC CGA ATT 180
Lys Pro Lys Arg Ser Met Lys Arg Asp Asp Thr Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Pro His Arg Leu Ile Glu Lys Lys Arg Arg Asp Arg Ile 60

AAT GAA TGC ATT GCT CAG CTG AAA GAT TTA CTG CCT GAA CAT CTG AAA TTG ACA ACT CTG GGA CAT CTG GAG AAA GCT GTA GTC TTG GAA 270
Asn Glu Cys Ile Ala Gln Leu Lys Asp Leu Leu Pro Gln His Leu Lys Leu Thr Thr Leu Gly His Leu Glu Lys Ala Val Val Leu Glu 90

Helix-1
TTA ACT TTG AAA CAC TTA AAA GCT TTA ACC GCC TTA ACC GAG CAA CAG CAT CAG AAG ATA ATT GCT TTA CAG AAT GGG GAG CGA TCT CTG 360
Leu Thr Leu Lys His Leu Lys Ala Leu Thr Ala Leu Thr Glu Gln Gln His Gln Lys Ile Ile Ala Leu Gln Asn Gly Glu Arg Ser Leu 120

Helix-2
AAA TCG CCC ATT CAG TCC GAC TTG GAT GCG TTC CAC TCG GGA TTT CAA ACA TGC GCC AAA GAA GTC TTG CAA TAC CTC TCC CGG TTT GAG 450
Lys Ser Pro Ile Gln Ser Asp Leu Asp Ala Phe His Ser Gly Phe Gln Thr Cys Ala Lys Glu Val Leu Gln Tyr Leu Ser Arg Phe Glu 150

Helix-3
AGC TGG ACA CCC AGG GAG CCG CGG TGT GTC CAG CTG ATC AAC CAC TTG CAC GCC GTG GCC ACC CAG TTC TTG CCC ACC CCG CAG CTG TTG 540
Ser Trp Thr Pro Arg Glu Pro Arg Cys Val Gln Leu Ile Asn His Leu His Ala Val Ala Thr Gln Phe Leu Pro Thr Pro Gln Leu 180

ACT CAA CAG GTC CCT CTG AGC AAA GGC ACC GGC GCT CCC TCG GCC GCC GGG TCC GCG GCC GCC CCC TGC CTG GAG CGC GCG GGG CAG AAG 630
Thr Gln Gln Val Pro Leu Ser Lys Gly Thr Gly Ala Pro Ser Ala Ala Gly Ser Ala Ala Pro Cys Leu Glu Arg Ala Gly Gln Lys 210

CTG GAG CCC CTC GCC TAC TGC GTG CCC GTC ATC CAG CGG ACT CAG CCC AGC GCC GAG CTC GCC GCC GAG AAC GAC ACG GAC ACC GAC AGC 720
Leu Glu Pro Leu Ala Tyr Cys Val Pro Val Ile Gln Arg Thr Gln Pro Ser Ala Glu Leu Ala Ala Glu Asn Asp Thr Asp Thr Asp Ser 240

GGC TAC GGC GGC GAA GCC GAG GCC CGG CCG GAC CGC GAG AAA GGC AAA GGC GCG GGG GCG AGC CGC GTC ACC ATC AAG CAG GAG CCT CCC 810
Gly Tyr Gly Gly Glu Ala Glu Ala Arg Pro Asp Arg Glu Lys Gly Lys Gly Ala Gly Ala Ser Arg Val Thr Ile Lys Gln Glu Pro Pro 270

GGG GAG GAC TCG CCG GCG CCC AAG AGG ATG AAG CTG GAT TCG CCG CCG CCG CGT TCC CCT GCC TGT CCT CGG TGT TGT CGC CCC CTC 900
Gly Glu Asp Ser Pro Ala Pro Lys Arg Met Lys Leu Asp Ser Pro Pro Pro Pro Arg Ser Pro Ala Cys Pro Arg Cys Cys Arg Pro Leu 300

CCG AGA AGG CCG GCG CCG CCG CCG CGA CCC TCC TGC CGC ACG AGG TGG CGC CCC TTG GGG CCG CGC ACC CCC AGC ACC CGC ACG GCC GCA 990
Pro Arg Arg Arg Ala Pro Pro Pro Arg Pro Ser Cys Arg Thr Arg Trp Arg Pro Leu Gly Arg Arg Thr Pro Ser Thr Arg Thr Ala Ala 330

CCC ACC TGC CCT TCG CCG GGC CCC GCG AGC CGG GGA ACC CGG AGA GCT CTG CTC AGG AAG ATC CCT CGC AGC CAG GAA AGG AAG CTC CCT 1080
Pro Thr Cys Pro Ser Pro Gly Pro Ala Ser Arg Gly Thr Arg Arg Ala Leu Leu Arg Lys Ile Pro Arg Ser Gln Glu Arg Lys Leu Pro 360

GAA TCC TTG CGT CCC GAA GGA CGG AGG TTC AAG CAG AGT GAG AAG TTA AAA TAC CCT TAA GGAGTTCAAGCAGAGTGAGAAGTTAAATACCCCTTAAG 1179
Glu Ser Leu Arg Pro Glu Gly Arg Phe Lys Gln Ser Glu Lys Leu Lys Tyr Pro *** 379

GTCTTTAAGGGAGGAAGTGATAGATGACAGCAGGCAATAACAAGAACAAACAAACAGGTGTTATGTGTACATTGGAGTTCCTGTTTGTCTCATCCCGCACCACCCACCCCTCCAC 1298

ACACTAACATCCCTTTCTTCCCCCACCAGCTGTAAAGATCTATGCGAAGACACTGGCTCTTTTAAATCCCAAAATTTTGGCCCCCTTTTAGGCCATGTTCCATTATCT 1417

CTTAAATTTGGAACCTAATTCGAGAGGAAGTAAGAAGGCTCTGTTCTGTGCTGAGCTAGGTGAACCCCGGGTAGGGGAAGATGTAACACCTTTGACGCTTTTGGAGTTGACATGG 1536

AACAGCAGTAGTTGTTATGTAGAGCTAGTTCCTCAAGCTGCCCTGCTTTTAGGAGGCGTTCACAAACAGATTGAGGCTCTTTTAGAATTGAATTTACTCTTCAGTATTTCTA 1655

ATGTTACAGTTTCTAAAGGCATATATTTTCAAGAAAGTGAGGATGCACTTCTCAGCTTGCAACCTATTCTGAAGTGGTTAAATGGTATCTCTTAGTAACCTGCACTGTTAAAGA 1774

AACACGAGCTGGGCCATGTCAGAACTAAGTCAGGAAGGAGATGAGTGAAGGCCAGAACTATTCTAGTACATTGCTAACACTTTATTGAGAAATTGACCATGAATTAATGGAC 1893

TCATCTTAATTTCTTCTAAGTCCATATATAGATAGATCTATCTGTACAGATTCTATTTATCCATAGATAGGTATCTATACATACACATCTCAAGTGCACTATTCCCACTCTCATT 2012

AATCCATCATGTTCTCAAAATTTTGTAACTTACTGTAAAAAAGTGCACTGAACCTCAAAACAAAAACAAACAAACAAACAAAGTCCAACTGATATATCCTATATTC 2131

TGTTAAATTTCAAAAGTGAACGAAGCATTTAACTGGCCAGTTTGTATTGCAAAATGCTGTAAGATAGATAAGTGAAGTCTGTGAGGCTTCTATCTCCAAGTCTATGTTTCTGG 2250

AGACCAACCCAGATACCGAATAACACAAGAAAGCTTTTAAATAGGCTTAAACCAAGCCTTGCTACAGATTTTGTAGTTTGTGCAAGGTAGCACTGTGAGAAATCTCACTGG 2369

ATGTTATGTAAGGGGTGAGACACACAGCTGACTATGAGTGAGGAAATATCTGGGCTTTTTCGTCAGTTTGGTGCATTGCTGCTGCTGTGCTACTGTTTGGCTCAACCGCTGTGT 2488

TTAAACAACGTTAAACTTTAGCCTACAAGGTGGCTCTTATGTACATAGTTGTTAATACATCCAATTAAATGATGCTGACATGCTATTTTGTAGGGAGAAAATATGCTCTAATGATAT 2603

TTTGAGTTAAATATCTTTTGGGAGGAGTTTGTGAAAGTTGCACCTTTTGTACAATGCTTATGCTTGAACGCTTATGCTGCTTAAATTTTAAAAAAATTTAAATACTGTCT 2726

GTGAGAAACCGCTGGTTAGAAAGTTAGTATGTCAGCATAACTAGAAATACCTTTATTTATCTAGTATTTTTCAGCACTCCATAAATCTATTACCTAAATATTGCCACACTATTT 2845

TGTGATTTAAAAATCTTACTAAGGAATTTAACTTAAATATACCATATGATATGCTCAATAATTTAAAAAGACATAATGGATGCTCAATTAGTTTAAAGATATCTATAACTATAGGG 2964

ATACAACTACACAGTTCTCAGATTTACACCTTTTGTGTCATTGGCTGTGTCACACATTTCCAATCTCTGCAAGCCTCCAGGCTCTGGCTTTGTCTACCTGCTGCTGCCAAT 3083

GTATCTTAATGAAAGTGCAAAAGAAAAACCTACCAATTTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA 3140

【図 2】

Maximum Matching [human DEC2,ami VS DEC1, ami]

human DEC2,ami: 1 - 380

DEC1, ami : 1 - 413

Matching Percentage (Total Window: 43%, Alignment Window: 43%)

```

human DEC2 1 MDEGIPHLQERQ--L-----LEHRDFIGLDYSSL---Y---MCKP-K-RS 50
             |||||               |||||               |||||
DEC1 1 M-ERIPSAQPPPACLPKAPGLEH---G-D---LPGMPAHMYQVYKSRR 50

51 M-KRD-DTKDTYKLPHRLIEKKRRDRINECIAQLKDILLPEHLKLTTLGHL 100
             |||||               |||||               |||||
51 GIKRSEDSKETYKLPHRLIEKKRRDRINECIAQLKDILLPEHLKLTTLGHL 100

101 EKAVVLELTLKHLKALTALTEQOQHOKIIALONG----ERSLKSPI----- 150
             |||||               |||||               |||||
101 EKAVVLELTLKHVKALTNLIDQQQKIIALQSGLQAGE--L-SGRNVETG 150

151 QSDLDAFHSGFQTCAKEVLQYLSRFESWTPREPRCVQLINHLHAVATQFL 200
             |||||               |||||               |||||
151 QEM---FCSGFQTCAREVLQYLAKHEN-T-RDLKSSQLVTHLHRVSELL 200

201 PTPQLLTQQVPLS----KGTGA---PSA-A-GSAAAPCLERAGQKLEPLA 250
             |||||               |||||               |||||
201 ---QGTSRKP-SDPAPKVMDFKEKPSSPAKGSEG-P-----G-KN----- 250

251 YCVFVIQRTQP-SA-ELAAENDTDTDSGYGGEAEARPD-R-E---K--- 300
             |||||               |||||               |||||
251 -CVFVIQRTFAHSSGEQSGS-DTDTDSGYGGESEKG-DLRSEQPCFKSDH 300

301 GK----GA--GASRVTIKQEPGEDSPAP-K--RMKL-D-----SPPPP 350
             |||||               |||||               |||||
301 GRRFTMGERIGA----IKQESE-E--P-PTKKNRMQLSDDEGHFTSSDLI 350

351 RSPACPRCCRPL-PRRRAPP-PRPSCRTRWRP--LGRRTPTSTRTAA-PT- 400
             |||||               |||||               |||||
351 SSPF-----LGPH---PHQP-PFCL----PFYLIP--PSA-TAYLPML 400

401 --C--P-S-PG--P---ASRGTRRALLR-----KI--PRS--QERKLPE 450
             |||||               |||||               |||||
401 EKCWYPTSVFVLYPGLNASAA---ALSSFMNPDKISAPLLMPQ-R-LP-S 450

451 -LRPEGRRFKQSEKL---KY-P-----*..... 500
             |||||               |||||               |||||
451 PL-PAHPSVDSSVLLQALKPIPLNLETKD*..... 500

```

【図 3】

Maximum Matching [human DEC2,ami VS Sharp 1, ami]

human DEC2,ami: 1 - 380

Sharp 1, ami : 1 - 254

Matching Percentage (Total Window: 59%, Alignment Window: 59%)

```

human DEC2 1 MDEGIPHLQERQLLEHRDFIGLDYSSLYMCKPKRSMKRDDTKDITYKLPHR 50
             |||
Sharp 1 1 MDEGIPHLQERQLLEHRDFIGLDYSSLYMCKPKRSLKRDDTKDITYKLPHR 50
             |||

51 LIEKKRRDRINECIAQLKDLLPEHLKLTTLGHLEKAVVLELTLKHLKALT 100
             |||
51 LIEKKRRDRINECIAQLKDLLPEHLKLTTLGHLEKAVVLELTLKHLKALT 100
             |||

101 ALTEQQHQKIIALQNGERSLKSPIQSDLDAPHSGFQTCAKEVLQYLSRFE 150
             |||
101 ALTEQQHQKIIALQNGERSLKSPVQADLDAPHSGFQTCAKEVLQYLARFE 150
             |||

151 SWTPREPRCVQLINHLHAVATQFLPTPQLLTQQVPLSKGTG-AP-SAAGS 200
             |||
151 SWTPREPRCAQLVSHLHAVATQLL-TPQV-T---PGR-GPGRAPCSA-G- 200
             |||

201 AAAPCLERA-GQKLEPLAYCVFVIQRTQPSAELAAENDTDTDSGYGGEAE 250
             |||
201 AAA-----ASGS--ERVARCVFVIQRTQPGTEP--EHD TDTDSGYGGEAE 250
             |||

251 ARPDREKKGKAGASRVTIKQEPPEGEDSPAPKRMKLDSPPPRSPACPRCC 300
             |||
251 QG--R-----A-A--V--KQEP PG-D-P-----S----- 300
             |||

301 RPLPRRRAPPPRPSCTRWRPLGRRTPTSTRTAAPTCPSPGPASRGTRRAL 350
             |||
301 --L-R--P--R-----G----- 350
             |||

351 LRKIPRSQERKLPESLRPEGRRFKQSEKLKYP*..... 400
             |
351 -----*..... 400

```

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規なbHLH型転写因子および該因子をコードする遺伝子、並びにそれらの製造および用途を提供する。

【解決手段】 ヒト由来のbHLH型転写因子を単離した。該転写因子は、ヒト軟骨細胞をcAMPで分化させた場合に発現が誘導される転写因子 DEC1 と相同性を有しており、DEC1サブファミリーに属する新規な転写因子と考えられる。本発明の転写因子は、神経細胞分化に関与するマウス *Stral3* やラット *SHARP* とも相同性を有している。本発明の転写因子は、細胞の分化や増殖が関与する疾患に対する医薬品開発のためのツールとして利用することが可能である。

【選択図】 なし